DOI:10.11931/guihaia.gxzw202303052

橡胶树形成层组织的酵母双杂 cDNA 文库构建及 HbHDA6 互作蛋白筛选

张世鑫[1]，吴绍华[1]，杨署光[1]，晁金泉[1]，史敏晶[1]，
葛立鑫[1,2]，蒋毅[1,2]，田维敏[1*]
（1. 中国热带农业科学院橡胶研究所/热带作物生物育种全国重点实验室/农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/海南省热带作物栽培生理学重点实验室，海口 571101；2. 西藏农牧学院，西藏 林芝 860000）

摘　要：乳管是天然橡胶合成和贮存的场所，是由维管形成层细胞分裂分化而来的。次生乳管的数量与天然橡胶产量直接相关，而这些乳管的数量取决于形成层分化次生乳管的频率（乳管分化能力），是橡胶树产量育种的主要指标。前期研究中，我们发现组蛋白去乙酰化酶（HDA）抑制剂曲古抑菌素 A（TSA）能诱导橡胶树乳管分化，且组蛋白去乙酰化酶基因（*HbHDA*6）能够参与橡胶树乳管分化调控。由于组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树乳管分化的分子机制尚未阐明，该文使用冠菌素（COR）诱导橡胶树形成层分化产生次生乳管的实验系统，分离形成层组织为材料，构建酵母双杂交 cDNA 文库，以 *HbHDA*6 基因为诱饵来筛选酵母双杂交文库，确定与 HbHDA6 相互作用的蛋白。结果表明：（1）利用 Gateway 技术构建的均一化 COR 诱导橡胶树形成层组织的酵母双杂交 cDNA 文库，初级文库的容量为 6.3×10^6，总单克隆数为 1.2×10^7，文库重组率为 100％；次级文库的容量为 7.7×10^6，总单克隆数为 1.5×10^7，文库重组率为 100％。初级文库和次级文库的插入片段平均长度，分别为 1.1 kb 和 1.2 kb。（2）成功构建了筛选 HbHDA6 互作蛋白的 pGBKT7-HbHDA6 诱饵载体，并确认无自激活活性。（3）使用该诱饵载体对构建的酵母双杂交 cDNA 文库进行筛选，并通过 NCBI_blast 比对和去除重复以后，获得了 22 个与 HbHDA6 发生互作的蛋白，包括 CLP1，ERF3，ERF4，HSP82，LARP6a，APT5，PP2A，FBA6 等。该研究成果为解析组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树乳管分化的分子机制提供理论基础，为转基因改良橡胶树的产胶潜力提供候选基因，为高性能天然橡胶遗传改良育种提供新线索。

关键词：巴西橡胶树，次生乳管分化，形成层，酵母双杂交，*HbHDA*6

The MYTH cDNA library from cambium with JA-induced laticifer differentiation and screening of HbHDA6 interacting proteins in *Hevea brasiliensis*

ZHANG Shixin[1], WU Shaohua[1], YANG Shuguang[1], CHAO Jinquan[1], SHI Mingjin[1],
GE Lixin[1,2]，JIANG Yi[1,2]，TIAN Weimin[1*]
(1. *Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Hainan Key Laboratory for Cultivation & Physiology of Tropical Crops*, Haikou 571101, China. 2. *Tibet Agricultural and Animal Husbandry*

基金项目：海南省自然科学基金高层次人才项目（322RC781）；国家自然科学基金项目（31800577）；现代农业产业技术体系建设专项（CARS-33-YZ1）。

第一作者：张世鑫（1986-），博士，副研究员，主要从事橡胶树乳管发育和分子育种研究，（E-mail）zhangshixin_1@163.com。
***通信作者**：田维敏，博士，教授，博士生导师，主要从事橡胶树分子育种研究，（E-mail）wmtian@163.com。

University, Linzhi 860000, Tibet, China)
Abstract: The secondary laticifer is the position for synthesis and storage of natural rubber (NR), which is differentiated from the vascular cambium of bark in stem of rubber trees (*Hevea brasiliensis*). The quantity of secondary laticifer is depend on the frequency of the secondary laticifer differentiation from cambia, which is the main index of yield breeding of rubber tree. In previous studies, we found trichostatin A (TSA), an inhibitor of histone deacetylase (HDA), can also induce laticifer differentiation, and the histone deacetylase gene (*HbHDA*6) is a participator in laticifer differentiation. Because of the molecular mechanism of secondary laticifer differentiation regulated by histone acetylation has not been clarified. So, we construct a yeast two-hybrid cDNA library used the vascular cambium tissues treatment by coronatine (COR), and screening the yeast two-hybrid library by *HbHDA6* gene as the bait, for determining the proteins interacting with HbHDA6. The results were as follows: (1) The homogenized yeast two-hybrid cDNA library of vascular cambium is successful and constructed by the technology of gateway. The capacity of the primary library is 6.3×10^6, the total number of clones is 1.2×10^7, and the capacity of secondary library is 7.7×10^6, the total number of clones is 1.5×10^7, the recombination rate of the libraries is 100%. (2) The average length of inserted fragments is 1.1 kb and 1.2 kb in primary and secondary library, respectively. The bait vector of pGBKT7-HbHDA6 is constructed and confirmed no self-activation activity. (3) The cDNA library is screened with the pGBKT7-HbHDA6 bait vector, found 22 proteins interacting with HbHDA6, including CLP1, ERF3, ERF4, HSP82, LARP6a, APT5, PP2A, APT5, FBA6, etc. The results provide a theoretical basis for analyzing the molecular regulatory network of the secondary laticifer differentiation of rubber tree, and provide candidate genes for the rubber production potential of genetically modified and a new clue for the genetic improvement and breeding of high-performance NR.
Key words: *Hevea brasiliensis*, secondary laticifer differentiation, vascular cambium, yeast two-hybrid, *HbHDA*6

天然橡胶是关系国民生计的重要工业原料和战略物资，世界所需的天然橡胶主要来自于巴西橡胶树（*Hevea brasiliensis*）（田维敏等，2015）。橡胶树树干树皮中的次生乳管是天然橡胶合成和贮存的主要场所，是由维管形成层纺锤状原始细胞分化而来的（Gomez, 1982；Hao & Wu, 2000；Chao et al., 2023）。随着形成层分化的次生乳管后，不断向外推移，要经过幼嫩-成熟-衰老-死亡，为维持产胶部位的乳管数量，需要形成层不断分化出新的次生乳管。而这些次生乳管的数量与天然橡胶产量直接相关，次生乳管数量取决于维管形成层分化次生乳管的频率（即次生乳管分化能力），是橡胶树产量育种的主要指标（田维敏等，2015；Chao et al., 2023）。前期研究中，我们团队最早发现外施茉莉酸（jasmonic, JA）及其前体亚麻酸(LA)能诱导形成层细胞分化成次生乳管（Hao & Wu, 2000；刘惠芳等，2001；Tian et al., 2003）。我们后续又发现与茉莉酸的活性形式 JA-Ile 结构相似的冠菌素(Coronatine, COR)（Ichihara et al., 1977），在诱导橡胶树次生乳管分化的效应方面比茉莉酸甲酯（MeJA）更好（张世鑫等，2011；Zhang & Tian, 2015）。并建立了一种稳定的 COR 诱导橡胶树萌条分化次生乳管的实验系统（Zhang & Tian, 2015；Zhang et al., 2015, 2016；Wu et al., 2016, 2023；张世鑫等，2018）。最近，我们发现组蛋白去乙酰化酶（HDA）的抑制剂——曲古抑菌素 A（TSA）也能够诱导橡胶树次生乳管分化（Zhang et al., 2016），使用 COR 处理能够显著提高形成层区的组蛋白乙酰化程度，而且 HDA 活性和含量也受影响。基于这些工作基础，以

及组蛋白乙酰化修饰作为基因转录调控的重要方式，我们推测 JA 诱导橡胶树次生乳管分化，可能是通过组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树次生乳管分化相关基因的转录而实现的。

酵母双杂交技术（yeast two hybrid technology）是研究蛋白质相互作用的经典技术之一，是由 Fields 和 Song 等人在研究真核生物基因转录调控中提出并初步建立的（Fields, 1993）。随着分子生物学的发展，在酵母双杂交的基础上又建立了酵母单杂交、膜体系酵母双杂交、酵母三杂交等多项技术，用于蛋白-蛋白、蛋白-DNA/RNA/配体之间相互作用的研究，在功能基因组学和互作组学研究中发挥重要作用。利用酵母双杂交系统能够快速、直接分析已知蛋白之间的相互作用，并能寻找、分离与已知蛋白相互作用的配体，在研究抗原和抗体相互作用、发现新的蛋白质和发现蛋白质的新功能、筛选药物作用位点及药物对蛋白互作影响、建立基因组蛋白连锁图等方面应用广泛。与 Pull down 技术、凝胶阻滞技术（electrophoretic mobility shift assay, EMSA）和表面等离子体共振技术（surface plasmon resonance, SPR）等体外的蛋白质相互作用的研究技术相比，酵母双杂交技术能够更好的模拟细胞内的环境，可以更真实的反映蛋白质之间的相会作用情况（Phizicky & Fields, 1995）。酵母双杂交系统的建立是基于对真核生物转录调控过程的认识，真核生物中基因转录需要反式转录激活因子的参与，真核生物的转录激活因子含有两个不同的结构域：DNA 结合结构域（DNA binding domain，DNA-BD）和 DNA 转录激活结构域（activation domain，AD），这两个结构域能够独立分开且功能相互不受影响。BD 和 AD 分别单独起作用时，是不能激活转录反应的，只有当 BD 和 AD 两者在空间上充分的接近时，才发挥完整的转录激活因子活性，促使下游基因的转录。因为酵母双杂交技术的这种特点，使其成为了鉴定与已知蛋白发生相互作用未知蛋白质的常用实验技术，并且在解析蛋白与蛋白间的分子调控网络中起着重要作用（Paiano et al., 2019）。

酵母双杂交 cDNA 文库构建技术在橡胶树分子生物学研究中也有广泛的应用，如巴西橡胶树胶乳酵母双杂交 cDNA 表达文库（杨子平等，2013），巴西橡胶树胶乳均一化酵母双杂交 cDNA 文库（余海洋等，2016），橡胶叶片和胶乳的 cDNA 文库（欧阳沫等，2016），巴西橡胶树地上部地下部均一化酵母双杂交 cDNA 文库（陈洪举等，2017），橡胶树未开割树和开割树胶乳的酵母双杂交 cDNA 文库（晁金泉等，2021），橡胶树膜系统酵母双杂交 cDNA 文库（聂智毅等，2022）等。由于组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树乳管分化的分子机制尚未阐明，而酵母双杂交文库构建和文库筛选能够获得大量的蛋白质相互作用信息，在构建橡胶树次生乳管分化分子调控网络具有显著的优势。本文使用冠菌素（COR）诱导橡胶树形成层分化产生次生乳管的实验系统，分离形成层组织为材料，构建酵母双杂交 cDNA 文库，以 *HbHDA6* 基因为诱饵来筛选酵母双杂交文库，筛选与 HbHDA6 相互作用的蛋白。旨在通过酵母双杂交技术筛选出组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树次生乳管分化的基因或转录因子，为解析橡胶树次生乳管分化的分子调控网络提供理论基础，为转基因改良橡胶树的产胶潜力提供候选基因，为高性能天然橡胶遗传改良育种提供新线索。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料为巴西橡胶树无性系热研 7-33-97 的一年生萌条，种植在中国热带农业科学院橡胶研究所的五队增殖苗圃内，这些萌条每年都经过锯杆，并通过基部的潜伏芽重新生长新的萌条，并在一年内生长 5~6 个伸长单位（extension unit, EU）（张世鑫等，2011）。

实验中用到的主要试剂和耗材：RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（DP441）、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（DP204）、质粒小提试剂盒（DP103）、酵母质粒提取试剂盒（DP112）购于天根生化科技（北京）有限公司；mRNA 分离及 cDNA 建库使用的试剂，选用 FastTrack® MAG mRNA isolation Kit (K158002)，LR Clonase™ II Enzyme Mix

(11791-020)，UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl: Alcohol (25:24:1, *V*/*V*) (15593-031)，5 M Ammonium Acetate (AM9070G)，PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (K2100-15)，ElectroMAX™ DH10B™ T1 Phage Resistant Cells (12033-015)均购于赛默飞世尔科技（中国）有限公司；Carrier DNA、培养基 YPDA、培养基 YPD plus、SD/Trp、SD/Leu、SD/His/Leu/Trp (TDO)、SD/Ade/His/Leu/Trp (QDO)、Aureobasidin A、X-α-Gal 均购自 Clontech 公司；FastPfu DNA Polymerase (AP221-01)购于北京全式金生物技术股份有限公司；冠菌素（coronatine, COR）、DMSO、乙酰丁香酮（acetosyringone）、MES、$MgCl_2$、PEG、TE、LiAc 等试剂均购于 Sigma 公司；其他试剂均为国产分析纯，枪头和离心管均为 Axygen 公司产品。

1.2 冠菌素(COR)处理植物材料

选取一年生橡胶树萌条的第三伸长单位（EU3），节间长且健壮的树干作为实验材料，在 EU3 树干中部，使用单面刀片刮去面积为 2 cm ×4 cm 的茎表皮及部分皮层，用面积略大的灭菌无尘纸包裹处理部位，施加含有 6 $\mu g \cdot mL^{-1}$ 的 COR 溶液，然后用塑料封口膜缠绕并密封包裹。处理时间，分别为 0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、1 d、2 d 和 3 d。然后拆去塑料封口膜和无尘纸，切取处理部位的树皮（带部分木质部），并立即分割成小块，置于 2 mL 离心管中，液氮速冻。每个时间点的形成层区样品取自于 5 株橡胶树萌条进行混合，并且每个时间点进行三组生物学重复，即每个时间点共计处理 15 株橡胶树萌条。

1.3 总 RNA 提取及 mRNA 的纯化

使用冰冻切片弦切的方法收集橡胶树树皮的形成层区组织，使用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（天根，DP441）提取总 RNA。通过微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度，使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性后，合格的总 RNA 样品于-80 ℃冰箱中保存备用。将得到的不同时间段 COR 处理的形成层区组织总 RNA 进行等量混合，再利用磁珠法 FastTrack® MAG mRNA isolation Kit (Invitrogen, K158096)对总 RNA 中的 mRNA 进行分离纯化，再将 mRNA 进行等量混合后，用于后续的酵母双杂交文库构建。

1.4 酵母双杂交文库的构建

利用 Gateway 重组技术，使用 CloneMiner™ II cDNA 文库构建试剂盒能够快速构建 cDNA 文库。操作流程：是将分离纯化并等量混合后好的 mRNA 为模板进行反转录，先合成 cDNA 第一链后合成 cDNA 双链，再将得到的双链 cDNA 进行分级分离并收集。使用 LR Clonase™ II Enzyme Mix 进行 BP 重组反应；使用 BTX 指数衰减波电穿孔仪 ECM630 进行电转化到大肠杆菌 ElectroMAX DH10B 感受态细胞中。将电转化后的菌液，在摇床里 37 ℃，220 $r \cdot min^{-1}$ 活化培养 1 h。培养结束后，取一部分菌液涂布平板进行初级文库库容量鉴定、重组率和插入片段长度鉴定。剩余的菌液加入甘油，至终浓度 20%，于-80 ℃保存，即得到 COR 诱导橡胶树形成层组织的 cDNA 初级文库菌液。

将上一步骤中验证合格的 cDNA 初级文库，使用 PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Life, K2100-15)提取文库质粒。将得到的初级文库质粒，稀释到 300 $ng \cdot \mu L^{-1}$，使用 LR Clonase™ II Enzyme Mix 进行文库质粒重组，并提取重组产物后使用 BTX 指数衰减波电穿孔仪 ECM630 将重组产物转化入大肠杆菌 ElectroMAX DH10B 感受态细胞中，然后进行培养，条件同上。取转化后的 10 μL 菌液稀释 1 000 倍，再取 50 μL 稀释后的菌液，涂布 LB 平板（含链霉素抗性），37 ℃培养过夜。进行次级文库库容量鉴定、重组率和插入片段长度鉴定。剩余的菌液加入甘油，至终浓度 20%，于-80 ℃保存，即得到 COR 诱导橡胶树形成层组织的 cDNA 次级文库菌液。文库的细菌菌落总数(CFU)计算方法如下：

$$cfu \cdot mL^{-1} = \text{平板上的克隆数}/50\ \mu L \times 1\,000\ \text{倍} \times 1 \times 10^3\ \mu L$$

$$\text{文库总 CFU} = cfu \cdot mL^{-1} \times \text{文库菌液总体积（mL）}$$

1.5 *HbHDA6* 诱饵质粒构建、鉴定及自激活检测

*HbHDA*6 诱饵质粒构建时，先对含有目的基因 *HbHDA*6 的载体进行 PCR 扩增后，进行 Sfi I 酶切，获得目的基因 *HbHDA*6 的克隆片段。使用 Sfi I 酶切，获得线性化的酵母双杂交诱饵载体(pGBKT7)，再将目的基因 *HbHDA*6 的克隆片段连接到线性化的诱饵载体(pGBKT7)上。

具体操作如下：根据 *HbHDA6* 基因的 cDNA 序列，设计引物时分别在其两端添加 Sfi I 的酶切位点序列，用于扩增 *HbHDA6* 基因的 cDNA 片段。引物序列如下：*HbHDA*6-F：5′-aaggccattacggccATGGGCGACACAACCGGTGGT-3′；*HbHDA*6-R：5′-ccggccgaggcggccTCAAGAACGCGGATGCTCTTCTCTCT-3′。并按照 FastPfu DNA Polymerase (AP221-01)高保真酶体系进行 PCR 扩增，使用 Sfi I 进行 *HbHDA*6 扩增片段的酶切和 pGBKT7 载体的线性化。使用 Axygen 胶回收试剂盒进行酶切产物回收。然后将回收的酶切产物，连接转化到大肠杆菌 Top10 中，在 37 ℃条件下恒温培养过夜。从上述连接体系转化平板（含链霉素抗性）上，随机挑取 4 个大肠杆菌转化子接种于 LB 液体培养基，37 ℃，220 r·min^{-1} 条件下振荡培养 16 h 后，用 pGBKT7 载体的通用引物：pGBKT7-F：5′-TAATACGACTCACTATAGGGC-3′，pGBKT7-R：5′-TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTAT-3′。进行 PCR 扩增验证，并使用 1%琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 扩增产物的检测。对扩增得到阳性条带的克隆，进行质粒抽提（Axygen 质粒小量抽提试剂盒）和测序。插入片段测序结果在比对确认正确后，进行后续实验。按照表 1 构建不同质粒和涂布不同类型的平板，将各种质粒转入酵母受体菌株 AH109 中，观察并检测结果。

表 1 构建酵母双杂交文库所需的载体

Table 1 The vectors for constructing yeast two-hybrid library

反应 Reaction	AD 载体 AD vector	BD 载体 BD vector	涂板种类 Coated plates	备注 Notes
1	pGADT7-largeT	pGBKT7-p53	SD-Trp-Leu	阳性对照 Positive control
2	pGADT7-largeT	pGBKT7-laminC	SD-Trp-Leu	阴性对照 Nagetive control
3	pGADT7	pGBKT7-HbHDA6	SD-Trp-Leu	自激活检测 Self-activation detection
4	—	pGBKT7-HbHDA6	SD-Trp	筛库备用 Library screening backup

从 pGADT7+pGBKT7-HbHDA6 共转化 AH109 长出的酵母转化子中，随机挑取了 6 个菌落，进行自激活检测，包括对 HIS3、ADE2 和 MEL1 共 3 个报告基因的检测。对 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因的检测采用点板培养的方法。将转化子点板 SD-TL+X-α-Gal 和 SD-TLHA 平板，30 ℃恒温培养 4 d，观察其生长状态。在预先配制好的 SD-TLHA 板上各涂布 200 μL X-α-Gal 溶液。待 X-α-Gal 溶液被平板培养基完全吸收后，将转化子菌液进行点板并培养。

1.6 pGBKT7-HbHDA6 诱饵质粒筛选酵母文库

用含有测序正确 pGBKT7-HbHDA6 诱饵质粒的 AH109 酵母转化子，作为受体菌来制备酵母感受态细胞。将 COR 处理橡胶树形成层组织的 cDNA 初级文库质粒转入酵母感受态细胞中，并将其涂在 SD-Trp-Leu-His+5 mmol·L^{-1} 3AT 平板上并倒置培养。然后从 SD-Trp 平板挑取单克隆菌斑，接种在 SD-Trp 液体培养基中，在 30 ℃、220 r·min^{-1} 条件下振荡培养 18 h，再转接到 YPDA 培养基中培养。使用紫外分光光度计，测定菌液测定初始浓度为 OD_{600}= 0.2；再在 30 ℃、220 r·min^{-1} 条件下振荡培养 4~5 h，中途使用紫外分光光度计测定菌液的浓度，当菌液浓度达到 OD_{600}= 0.6 即停止培养。将菌液离心并弃上清，重悬菌体。然后按照加入试剂的体积从大到小，依次加入 9.6 mL 的 50% PEG3350，1.44 mL 的 1 M LiAc，300 μL 的 ssDNA (10 mg·ml^{-1}），以及 25 μg 的文库质粒 DNA，并混匀体系。然后，在 30 ℃条件下水浴孵育 30 min 后，在 42 ℃条件下水浴热激 25 min，再在 30 ℃条件下水浴复苏 1 h，将复苏后的菌

液离心并重悬菌体。然后从重悬菌液中取 20 µl 酵母培养物经梯度稀释后，分别涂在 3 块 SD-TL 平板上，用于酵母文库的转化效率检测。剩余的酵母培养物，涂在 SD-TLH + 5 $mmol·L^{-1}$ 3AT 平板上，每块平板涂 200 µL，共涂 40 块平板。在 30 ℃条件下恒温倒置培养 3~4 d，观察并记录转化结果，分析转化效率。

1.7 阳性克隆鉴定和测序分析

在 pGBKT7-HbHDA6 诱饵质粒筛选酵母双杂交文库的平板中，挑取阳性克隆的单菌落，转接到 SD-TL 缺陷型培养基平板中，再在 30 ℃条件下恒温倒置培养 2~3 d。将在 SD-TL 缺陷型培养基平板上长出的初始阳性克隆转化子，分别用无菌水稀释后，接种到 SD-TL 和 SD-TLHA+X-α-Gal 缺陷平板上，进行 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因的检测，在 30 ℃条件下恒温培养 3~4 d。

对 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因的进行检测，显示结果为阳性对照在 SD-TL 和 SD-TLHA+X-α-Gal 缺陷型培养基平板上都能正常生长，并在 SD-TLHA+X-α-Gal 缺陷型培养基平板上的菌落呈现蓝色；而阴性对照由于不会激活 HIS3、ADE2 报告基因，在 SD-TL 缺陷型培养基平板上，是可以正常生长的，但菌落不呈现蓝色，而且在缺少 Histidine 和 Adenine 这两种成分的 SD-TLHA+X-α-Gal 缺陷型培养基平板上是不能生长的。因此，初始阳性克隆能在 SD-TLHA+X-α-Gal 缺陷型培养基平板上生长并使菌落呈现蓝色，表明同时激活了 HIS3、ADE2 和 MEL1 等三个报告基因。

为了鉴定筛选到的阳性克隆的基因信息，将上述阳性克隆的菌株，分别接种于 SD-TL 缺陷型液体培养基中，在 30 ℃、220 $r·min^{-1}$ 条件下振荡培养 16 h。使用酵母质粒提取试剂盒（天根，DP112）提取并纯化出酵母质粒。然后，将提取纯化好的酵母质粒，转化到大肠杆菌 Top10 感受态细胞中进行扩增，在 37 ℃、220 $r·min^{-1}$ 条件下振荡培养 16 h，使用大肠杆菌质粒小提试剂盒（天根，DP103）提取大肠杆菌质粒后并送样至生工生物工程(上海)股份有限公司进行 DNA 测序。将 DNA 测序结果与 NCBI_GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 比对分析，获得与 *HbHDA6* 发生相互作用的基因信息。

2 结果与分析

2.1 橡胶树树皮的形成层区组织分离、总 RNA 提取和 mRNA 分离纯化

使用冰冻切片弦切的方法分离 COR 处理的一年生橡胶树萌条树皮形成层区组织（图 1：A），通过光学显微镜观察，发现冰冻切片得到橡胶树树皮的形成层组织没有杂质，且绝大多数形成层区细胞呈长梭形且排列致密，几乎没有其他类型的细胞（图 1：B）。

利用 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（DP441）提取的形成层组织的总 RNA，使用 Thermo NanoDrop2 000 微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度，发现总 RNA 的浓度较高，平均为 1 642.98 $ng·µL^{-1}$，A260/A280 的平均值为 2.11，A260/A230 的平均值为 2.13；经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰，两个条带的亮度比值约为 2:1，说明提取的总 RNA 没有降解（图 1：C）。本实验中提取的 COR 不同时间段处理橡胶树形成层组织的总 RNA 质量较好，可用于后续的实验。

将 8 个时间点的 COR 处理形成层区组织总 RNA 进行等量混合后，利用磁珠法 FastTrack® MAG mRNA isolation Kit (Invitrogen, K158096) 对总 RNA 中的 mRNA 进行分离纯化，得到的 mRNA 经 1 %琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示分化纯化的 mRNA 呈弥散的条带且均匀分布（图 1：D），表明分离纯化得到的 mRNA 质量较好，可用于后续的实验。

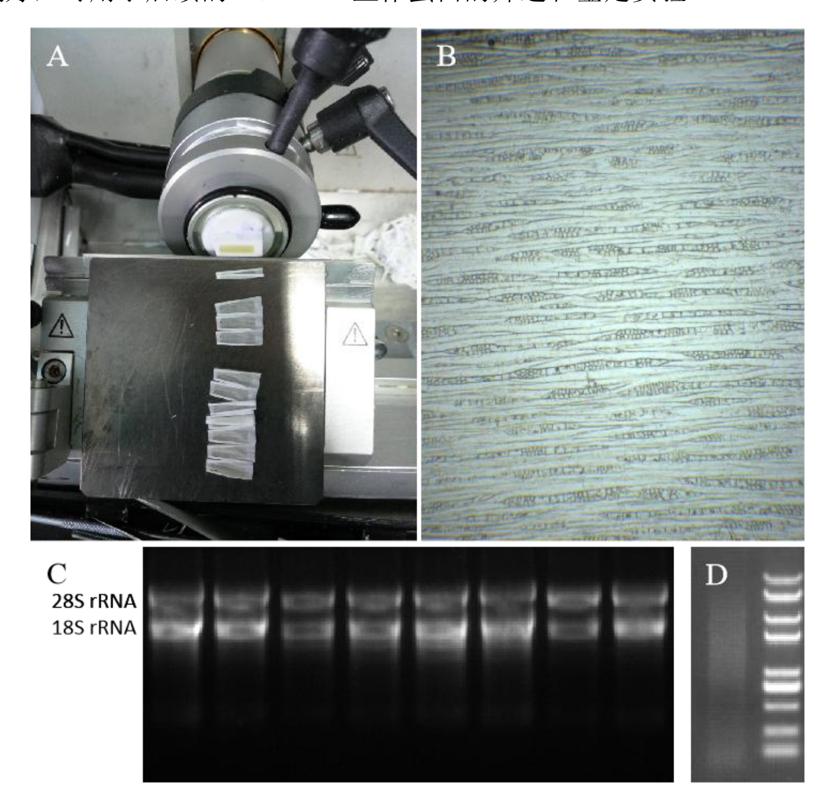
2.2 cDNA 初级文库和次级文库的构建和鉴定

将 COR 处理橡胶树形成层区组织的 cDNA 初级文库菌液的涂板并培养后（图 2：A），进行 cDNA 初级文库库容量鉴定、重组率和插入片段长度鉴定。结果表明，cDNA 初级文库的转化平板的 $cfu·mL^{-1}$（平板稀释度为 1:1 000）为 $cfu·mL^{-1}$= 317/50 µL×1 000×1 000

μL=6.3×10^6 cfu·mL^{-1}，高于文库构建的实验要求 1×10^6；总克隆数为 6.3×10^6 cfu·mL^{-1}×2 mL=1.2×10^7，也高于文库构建标准 1×10^7。并对 cDNA 初级文库的菌斑进行检测，随机调取 24 个菌斑进行 PCR 鉴定，发现插入效率为 100%，插入片段长度分布于 0.6~1.2 kb，平均插入片段长度 1.1 kb（图 2：C）。

将 COR 处理橡胶树形成层区组织的 cDNA 次级文库菌液的涂板并培养后（图 2：B），进行 cDNA 次级文库库容量鉴定、重组率和插入片段长度鉴定。结果表明，cDNA 次级文库转化平板的 cfu·mL^{-1}（平板稀释度 1:1 000）为 cfu·mL^{-1}= 386/50 μL×1 000 × 1 000 μL=7.7×10^6 cfu·mL^{-1}，高于文库构建的实验要求 1×10^6；总克隆数为 7.7×10^6 cfu·mL^{-1}×2 mL=1.5×10^7，也高于文库构建标准 1×10^7。并 cDNA 次级文库的菌斑进行检测，随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR 鉴定，发现插入效率为 100%，插入片段长度分布于 1.0~1.6 kb，平均插入片段长度 1.2 kb（图 2：D）。

综上所述，本研究构建的 COR 处理橡胶树萌条树皮形成层区组织的酵母双杂交 cDNA 文库质量较好，可用于后续的 HbHDA6 互作蛋白的筛选和鉴定实验。

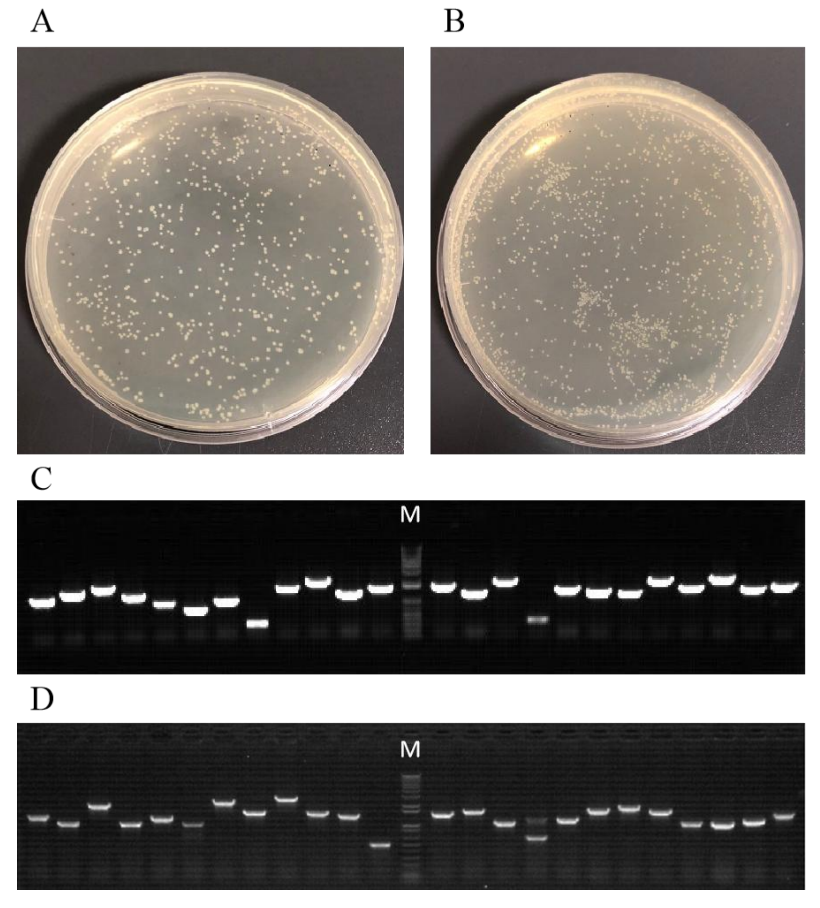


A 是利用冰冻切片技术分离的形成层组织样品；B 是 COR 处理 1 h 的橡胶树树皮形成层组织的弦切面图；C 是提取的形成层组织总 RNA 的电泳图；D 是利用磁珠法分离纯化 mRNA 的电泳图。

A is the cambium tissue isolated by freezing section technique; B is the tangential section of cambium tissue treatment by COR for 1 h; C is the electrophoretogram of total RNA extracted from cambium tissue; D is the electrophoretogram of mRNA is purified by magnetic bead method.

图 1 橡胶树萌条形成层组织分离、总 RNA 提取和 mRNA 纯化图

Fig. 1 Total RNA extraction and mRNA purification from the isolated cambium tissue in the bark of rubber shorts



A 和 B 分别为 cDNA 初级文库和次级文库的稀释液在 SD/-Leu 平板上生长情况；C 和 D 分别为 cDNA 初级文库和次级文库插入片段的 PCR 检测电泳图；M 为 DNA Maker。

A and B are the growth situation of primary cDNA library and secondary cDNA library on SD/-Leu plate, respectively; C and D are the electrophoretogram of inserted fragments in primary cDNA library and secondary cDNA library, respectively; M is the DNA Maker.

图 2 cDNA 初级文库、次级文库的平板生长情况和插入片段的 PCR 检测图

Fig. 2 The growth of cDNA primary library and secondary library and PCR detection of inserted fragments

2.3 HbHDA6 诱饵质粒构建、鉴定及自激活检测

将含有 *HbHDA6* 基因的载体进行 PCR 扩增，获得了约 1.7 kb 的条带（图 3：A），经过与目的基因的 DNA 序列进行测序比对，显示为 *HbHDA6* 的编码框。经过 SfiI 酶切，获得该目的基因 *HbHDA6* 的克隆片段，并与 Sfi I 酶切的线性化酵母双杂交诱饵载体质粒 pGBKT7 载体进行连接，获得酵母双杂交诱饵质粒 pGBKT7-HbHDA6。经过菌落 PCR 检测，发现条带大小均为 1.7 kb（图 3：B），且测序结果月目的基因的 DNA 序列比对正确，可进行后续的诱饵质粒的自激活检测实验。

从 pGADT7+pGBKT7-HbHDA6 质粒共转化到 AH109 酵母转化子中，随机挑取了 6 个菌落进行自激活检测，包括对 HIS3、ADE2 和 MEL1 共 3 个报告基因的检测。对 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因的检测采用点板培养的方法。将转化子点板 SD-TL+X-α-Gal 和 SD-TLHA 缺陷型平板，在 30 ℃条件下恒温培养 4 d，观察其生长状态，发现对照菌株在 SD-TL 缺陷型平板上都能正常生长，而仅有阳性对照 pGADT7-LargeT/pGBKT7-p53 可在 SD-TLHA+X-α-Gal 缺陷平板生长。而在含有目的基因的 pGADT7+pGBKT7-HDA6 转化子中随机挑选的 6 个菌落在 SD-TLHA+X-α-Gal 缺陷平板上均不能生长，生长状态同阴性对照 pGADT7-LargeT/pGBKT7-LaminC，MEL1 检测中结果也与阴性对照相同，因此不存在自激活（图 3：C）。

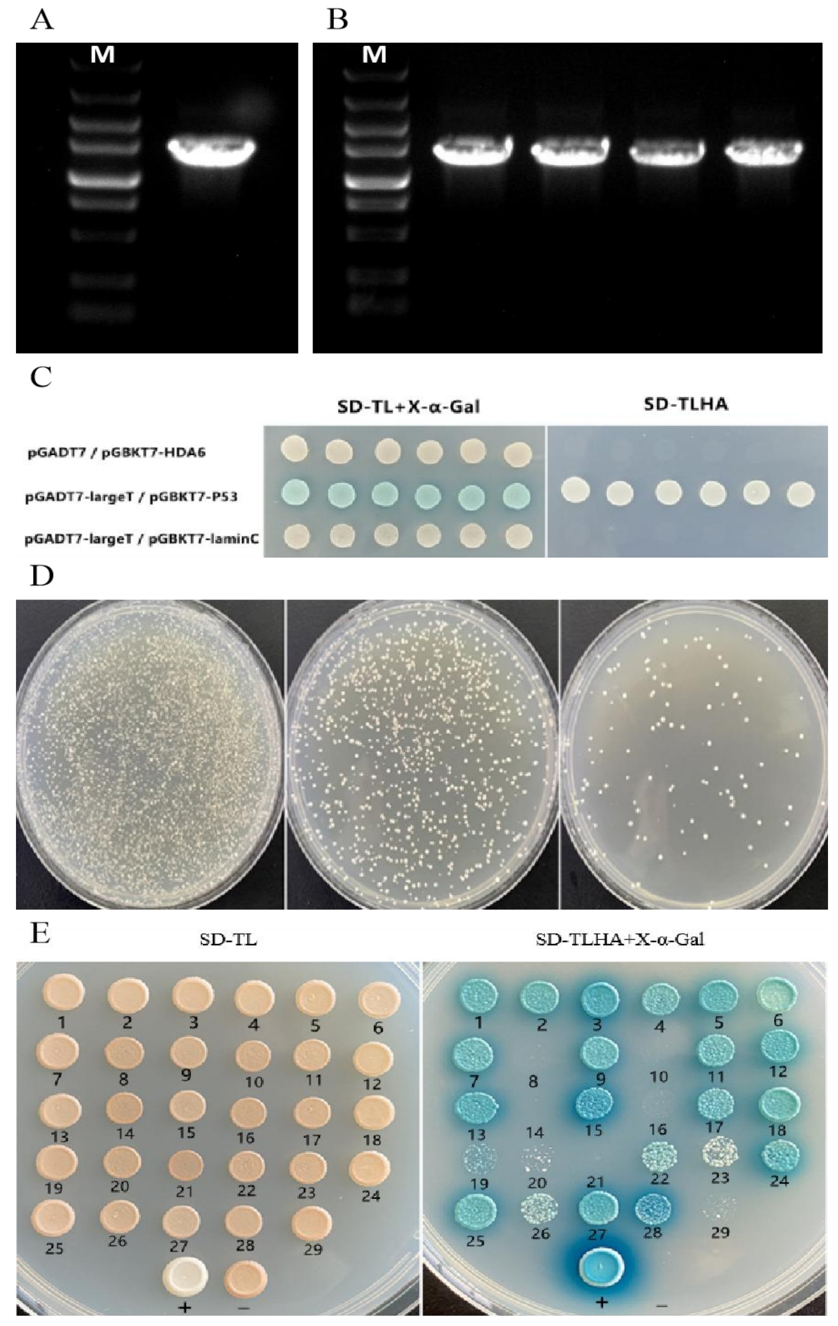
将 COR 处理橡胶树萌条树皮形成层区组织的酵母双杂交 cDNA 文库质粒转入，含有正确 pGBKT7-HDA6 诱饵质粒的 AH109 酵母转化子作为受体菌制备感受态中，从中取 20 μL 酵母培养物经梯度稀释后，分别涂 3 块 SD-TL 平板来检测文库转化效率（图 3：D）。对平板的菌斑进行计数，结果显示 HbHDA6 基因筛选文库的转化子总数为 $(3\ 978/20+2\ 038/2+286/0.2)\times1/3\times8\ 000 = 7.06\times10^6$，转化效率为 $7.06\times10^6/25\cdot\mu g^{-1} = 2.82\times10^5\cdot\mu g^{-1}$。

HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因的检测结果显示，阳性对照在 SD-TL+X-α-Gal 和 SD-TLHA 缺陷型培养基上都能正常生长，并使菌落呈蓝色，而阴性对照由于不会激活 HIS3、ADE2 报告基因，在 SD-TL 缺陷型培养基上可以正常生长而菌落但不显蓝色，但在缺少 Histidine 和 Adenine 这两种成分的 SD-TLHA 培养基上平板上不能生长。因此，本文获得的 24 个初始阳性克隆，能在 SD-TLHA 生长并使菌落显蓝色，表明同时都激活了 HIS3、ADE2 和 MEL1 报告基因（图 3：E）。

2.4 阳性克隆鉴定和互作蛋白分析

为了鉴定 pGBKT7-HDA6 诱饵质粒筛选到的阳性克隆的基因信息，将以上阳性克隆菌株分别接入 SD-TL 液体培养基中振荡培养过夜并提取纯化酵母质粒，再将抽提得到的酵母质粒转化大肠杆菌 Top10 新鲜感受态进行扩增，将含有阳性克隆的 Top10 转化子转接 LBA 液体培养扩增后抽提大肠杆菌质粒，并进行 DNA 测序分析，并与 NCBI_GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 比对分析。BLAST 比对结果显示，筛选到与 *HbHDA6* 基因相互作用的阳性克隆质粒 DNA，去除重复外，分别属于 22 种蛋白编码基因，结果表 2 所示。

根据 UniProt 的蛋白信息预测，可将与 HbHDA6 互作的 22 种蛋白分为氧化还原酶、水解酶、蛋白/DNA/RNA 结合、运输、异构酶、染色质调节剂和糖蛋白 7 个类别，其中水解酶、氧化还原酶、蛋白/DNA/RNA 结合 3 个类别的蛋白较多。根据亚细胞定位的结果显示这 22 种蛋白在细胞各个部位都有分布，其中亚细胞定位在细胞膜、叶绿体、线粒体和细胞核 4 个类别的蛋白相对较多。



A 和 B 分别为 *HbHDA*6 的 PCR 扩增和连接诱饵质粒后的电泳图；C 为 HbHDA6 诱饵质粒自激活检测结果；D 为 *HbHDA*6 基因筛选的文库转化效率分析图；E 为酵母文库筛选得到阳性克隆检测图。

A and B are the electrophoretic of the PCR amplification of *HbHDA*6 and it's bait plasmid, respectively; C is the self activation detection result of HbHDA6 bait plasmid; D is the analysis chart of transformation efficiency of the library screened for *HbHDA*6; E is the positive clone obtained by screening yeast library.

图 3 HbHDA6 诱饵质粒构建、鉴定及自激活检测图

Fig. 3 Construction, identification, and self activation detection of HbHDA6 bait plasmid

表 2 与 HbHDA6 互作的蛋白信息

Table 2 The formation of proteins interaction with HbHDA6

编号 No.	蛋白质描述 Protein description	cDNA 长度 cDNA length (bp)	得分 Score	覆盖度 Query cover（%）	*E* 值 *E* value	分子功能 Molecular function	亚细胞定位 Subcellular localization
1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1	1 003	1 709	99	0	氧化还原酶 Oxidordeuctase	线粒体 Mitochondrion
2	DNA J protein	1 035	1 637	97	0	蛋白结合 Protein binding	细胞质、细胞膜 Cytoplasm, cytomembrane
3	Subtilisin-like protease SBT1.5	1 026	1 711	96	0	水解酶 Hydrolase	胞外区、细胞膜 Extracellular region, cytomembrane
4	6-phosphogluconolactonase 1	975	1 548	85	0	水解酶 Hydrolase	叶绿体 Chlorplast
5	TORTIFOLIA1-like protein 3	991	1 724	99	0	微管结合 Microtubule binding	微管 Microtubule
6	Fructose-bisphosphate aldolase 6	995	1 783	100	0	肌动蛋白结合 Actin binding	细胞质、细胞膜 Cytoplasm, cytomembrane
7,25	Chitinase-like protein 2	988	1 735	99	0	水解酶 Hydrolase	质外体、高尔基体 Apoplast, Golgi appartus
9	Trafficking protein particle complex II-specific subunit 130 homolog	983	1 724	98	0	运输 Transport	胞质溶胶 Cytosol
11	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	1 010	1 810	99	0	氧化还原酶 Oxidordeuctase	线粒体、叶绿体 Mitochondrion, chlorplast
12	Protein disulfide-isomerase SCO2-like	1 028	1 506	79	0	异构酶 Iosmerase	叶绿体 Chlorplast
13	Cyclase-associated protein 1-like	1 035	1 637	90	0	肌动蛋白结合 Actin binding	细胞质 Cytoplasm
15	WD-40 repeat-containing protein MSI4-like	569	1 042	99	0	染色质调节剂 Chromatin regulator	胞质溶胶、线粒体、核 Cytosol, mitochondrion, nucleus
17	Aspartic proteinase-like	977	1 661	95	0	水解酶 Hydrolase	细胞膜 Cytomembrane
18	Fasciclin-like arabinogalactan protein 2	1 045	1 314	90	0	糖蛋白 Glycoprotein	细胞膜 Cytomembrane
19	UBP1-associated protein 2B-like	993	1 735	99	0	RNA 结合 RNA binding	核 Nucleus
20,29	Non-classical arabinogalactan protein 31-like	1 022	1 692	92	0	RNA 结合 RNA binding	细胞壁、细胞膜 Cytoderm, cytomembrane
22	Catalase isozyme 2	1 035	1 842	97	0	氧化还原酶 Oxidordeuctase	细胞质 Cytoplasm
23	Serine/arginine-rich splicing factor SR45a-like	1 033	831	47	5e-149	RNA 结合 RNA binding	剪接体复合体 Spliceosome complex
24	Subtilisin-like protease SBT1.6	897	1 413	85	0	水解酶 Hydrolase	细胞膜 Cytomembrane
26	Isoaspartyl peptidase/L-asparaginase 2	1 052	1 692	92	0	水解酶 Hydrolase	细胞质 Cytoplasm
27	Mitochondrial inner membrane protease subunit 2	588	1 074	99	0	水解酶 Hydrolase	叶绿体、线粒体、核 Chlorplast, mitochondrion, nucleus
28	Zinc finger CCCH domain-containing protein 3	734	1 256	92	0	DNA/RNA 结合 DNA/RNA binding	核 Nucleus

3 讨论与结论

从动植物组织或细胞中提取的总 RNA 和纯化的 mRNA 是构建酵母双杂交 cDNA 文库的起始材料，能够获得高质量的总 RNA 和 mRNA 是构建高质量酵母双杂交 cDNA 文库的前提（Gao et al., 2014）。本研究中对橡胶树树皮的维管形成层组织，是夹在韧皮部和木质部之间，为几层至十几层形成层纺锤状细胞组成且排列精密，较难获取到完整且纯净的形成层组织。前期研究中，我们发现橡胶树萌条形成层细胞层数有明显规律，在海南岛每年春季新梢生长期（3—4 月）树干的形成层区开始分裂分化活动，此时形成层的细胞层数最少（约 4 层）（Wu et al., 2002），而在 7—8 月份正值高温高湿环境，利于橡胶树萌条生长和维管形成层细胞分裂活动，此时的形成层的细胞层数最多（10~11 层）（张世鑫等，2011）。本文在 7—8 月时，采集萌条 EU3 的节间树皮样品，此时的形成层细胞最多且 EU3 的次生韧皮部未分化出次生乳管，能够获得最多且纯净的形成层区组织。使用冰冻切片弦切获取形成层区组织，光学镜检发现冰冻切片得到橡胶树树皮的形成层区组织没有杂质，绝大多数形成层区细胞呈长梭形且排列致密，所以有限的组织材料，也能提取出含量较高、质量较好的总 RNA。后续使用成熟的磁珠法技术分离纯化 mRNA，获得的 mRNA 捕获率和成功率都很好（Albretsrn et al., 1990），保证了后续构建酵母双杂交 cDNA 文库研究所需的高质量总 RNA 和 mRNA。使用 mRNA 反转录合成 cDNA，在均一化前后都进行一轮 LD-PCR，这样通过两轮的 LD-PCR 放大，不仅能够保证在起始总 RNA 较少的情况下纯化收集到足够量的 cDNA 用于文库构建，而且能够使低丰度的基因得到增加，相应的提高了筛库筛到低丰度基因的概率（杨子平等，2013；余海洋等，2016）。

对酵母双杂交 cDNA 文库质量评判主要从三个重要的数据来分析，分别为酵母双杂交文库的单克隆数、重组率和插入片段长度。酵母双杂交文库的单克隆数代表了构建的 cDNA 文库完整性和覆盖度，插入片段的长度代表了 cDNA 文库包含基因的完整性（Van & Beyaert, 1996）。cDNA 文库的单克隆是保证 cDNA 文库完整性和覆盖度的一个重要指标，文库单克隆数大于 $1×10^6$ 是文库筛选所必须的（李可琪等，2016）。一方面，本文中利用 Gateway™ 技术构建了茉莉酸诱导橡胶树次生乳管分化形成层组织的均一化酵母双杂交 cDNA 文库，初级文库容量为 $6.3×10^6$，总单克隆数为 $1.2×10^7$，次级文库的容量为 $7.7×10^6$，总单克隆数为 $1.5×10^7$，文库重组率均为 100%，这些数值均要高于酵母双杂交 cDNA 文库构建的基本要求。另一方面，构建的酵母双杂交 cDNA 初级文库和次级文库的插入片段平均长度分别为 1.1 kb 和 1.2 kb，这个数值是接近于本文使用的橡胶树热研 7-33-97 基因组序列中公布的 CDS 平均长度（Tang et al., 2016）。由此可见，本文构建的 COR 处理橡胶树萌条树皮形成层组织的酵母双杂交文库的单克隆数、重组率和插入片段长度均达到较高水平，满足酵母双杂交文库筛选的工作。

前期研究中，本团队最早发现外施 JA 及其前体亚麻酸（LA）能诱导形成层细胞分化次生乳管（Hao & Wu, 2000；Tian et al., 2003），与茉莉酸的活性形式 JA-Ile 的结构相似的 COR 可以与 COI1 受体结合，激活 JA 信号途径（Katsir et al., 2008），其诱导橡胶树乳管分化的效应比 MeJA 更好（张世鑫等，2011）。据此，我们建立了一种稳定的 COR 诱导橡胶树萌条次生乳管分化的实验系统，在 COR 处理后的 5 d 内可以观察到诱导形成的次生乳管（Zhang & Tian, 2015；Zhang et al., 2015.2016；Wu et al., 2016, 2023；张世鑫等，2018）。近期我们发现组蛋白去乙酰化酶(HDA)的抑制剂——曲古抑菌素 A(TSA)也能够诱导橡胶树次生乳管分化（Zhang et al., 2016），而且 COR 处理能够显著提高形成层区的组蛋白乙酰化程度，且 HDA 活性、尤其是 HDA6 含量和基因表达都受 COR 的影响（未发表资料）。基于这些工作基础以及组蛋白乙酰化修饰作为基因表达调控的重要方式，本文构建了 COR 处理橡胶树萌条树皮形成层组织的酵母双杂交文库，并通过 HbHDA6 诱饵载体进行酵母双杂交文库筛

选，共筛选到与 *HbHDA6* 基因相互作用 22 种蛋白。根据 UniProt 的蛋白信息预测，这些蛋白可分为氧化还原酶、水解酶、蛋白/DNA/RNA 结合、运输、异构酶、染色质调节剂和糖蛋白 7 个类别，其中水解酶、氧化还原酶、蛋白/DNA/RNA 结合等 3 种类别的蛋白较多。亚细胞定位结果，显示主要集中在细胞膜、叶绿体、线粒体和细胞核等。下一步，我们将对 HbHDA6 与这 22 个互作蛋白进行点对点酵母双杂交验证，解析这些蛋白的相互作用，为后续筛选组蛋白乙酰化修饰调控橡胶树次生乳管分化的靶标蛋白奠定基础，为构建橡胶树次生乳管分化的分子调控网络提供理论依据。

参考文献：

晁金泉，赵一杰，吴绍华，等，2021．巴西橡胶树 HbHMGR1 在开割前后胶乳中的互作蛋白筛选[J]．分子植物育种，19(24)：8151-8159． [CHAO JQ, ZHAO YJ, WU SH, et al., 2021. Screening of HbHMGR1-interacted proteins in latex of virgin and tapped rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) [J]. Mol Plant Breed, 19(24):8151-8159.]

陈洪举，张浩，高乐，等，2017．巴西橡胶树地上部地下部均一化酵母双杂交 cDNA 文库构建及评价[J]．分子植物育种，15(2)：468-473. [CHEN HJ, ZHANG H, GAO L, et al., 2017. Construction and evaluation of a normalized yeast two-hybrid cDNA library of the aboveground part and underground part of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) [J]. Mol Plant Breed, 15(2):468-473.]

李可琪，王莎莎，曾新华，等，2016．甘蓝型油菜温敏 GMSTE5A 幼蕾酵母双杂交 cDNA 文库的构建及筛选[J]．中国油料作物学报，38(3)：292-299．[LI KQ, WANG SS, ZENG XH, et al., 2016. Construction and screening of yeast two-hybrid cDNA library of flower bud from a dominant thermo-sensitive genic male sterile line TE5A in *Brassica napus* [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2016, 38(3): 292-299.]

刘惠芳，吴继林，郝秉中．2001．茉莉酸和其他激素对巴西橡胶树乳管分化的协同作用[J]．热带作物学报，22(3)：6-16.[LIU HF, WU JL, HAO BZ, 2001. Effect of jasmonic acid and other plant growth regulators on laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis* [J]. Chin J Trop Crops, 22(3) : 6-16.]

聂智毅，康桂娟，覃怀德，等，2022．橡胶树膜系统酵母双杂交 cDNA 文库构建及 *HbSRPP7* 互作蛋白筛选[J]．热带作物学报:1-12[2023-09-25]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20221012.1504.008.html.[NIE ZY, KANG GJ, QING HD, et al., 2022.Construction of a normalized *Hevea brasiliensis* latex MYTH cDNA library and screening of HbSRPP7 interacting proteins [J]. Chin J Trop Crops:1-12[2023-09-25]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.S.20221012.1504.008.html.]

欧阳沫，唐潇，黄惜，等，2016．巴西橡胶树 *HbICE1* 基因酵母双杂交诱饵载体的构建及互作蛋白的筛选[J]．植物科学学报，34(2)：255-262． [OUYANG M, TANG X, HUANG X, et al., 2016. Construction of yeast two-hybrid Bait vector and the screening of proteins interacting with *HbICE1* in *Hevea brasiliensis* [J]. Plant Sci J, 34(2): 255-262.]

田维敏，史敏晶，谭海燕，等，2015. 橡胶树树皮结构与发育[M]. 北京：科学出版社.[TIAN WM, SHI MJ, TAN HY, et al., 2015. Structure and development of bark in *Hevea brasiliensis* [M]. Beijing: Science Press.]

杨子平，李辉亮，郭冬，等，2013．巴西橡胶树胶乳酵母双杂交 cDNA 表达文库的构建及分析[J]．热带生物学报，4(4)：303-307． [YANG ZP, LI HL, GUO D, et al., 2013. Construction and analysis of latex cDNA Library for a yeast two-hybrid library [J]. J Trop Biol, 4(4):303-307.]

余海洋，张宇，王萌，等，2016. 巴西橡胶树胶乳均一化酵母双杂交 cDNA 文库构建[J]. 植物生理学报，52 (3)：312-316．[YU HY, ZHANG Y, WANG M, et al., 2016. Construction of a normalized yeast two-hybrid cDNA library of the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) [J]. Plant Physiol J, 52 (3): 312-316.]

张世鑫，刘宁涛，杨署光，等，2018．巴西橡胶树次生乳管分化能力的早期评价方法研究[J]．热带作物学报，39(7)：1266-1275． [ZHANG SX, LIU NT, YANG SG, et al., 2018. Early evaluation method of secondary laticifer differentiation ability in *Hevea brasiliensis* [J]. Chin J Trop Crops, 39(7):1266-1275.]

张世鑫，刘世彪，田维敏，2011．形成层活动对机械伤害诱导巴西橡胶树次生乳管分化的影响[J]．热带作物学报，32(6)：1037-1041． [ZHANG SX, LIU SB, TIAN WM, 2011. Effect of vascular cambia activity on secondary laticifer differentiation induced by mechanical wounding in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. Chin J Trop Crops, 32(6): 1037-1041.]

ALBRETSRN C, KALLAND KH, HAUKANES BI, et al. 1990. Applications of magnetic beads with covalently attached oligonucleotides in hybridization: isolation and detection of specific measles virus mRNA from a crude cell lysate [J]. Anal Biochem, 189(1): 40-50.

CHAO JQ , WU SH, SHI MJ, et al., 2023. Genomic insight into domestication of rubber tree[J]. Nat Commun, 14(1):4651.

FIELDS S, 1993. The two-hybrid system to detect protein-protein interactions [J]. Methods, 5(2): 116-124.

GAO XH, JIA RY, WANG MS, et al., 2014. Construction and identification of a cDNA library for use in the yeast two-hybrid system from duck embryonic fibroblast cells post-infected with duck enteritis virus [J]. Mol Biol Rep, 41: 467-475.

GOMEZ JB, 1982. Anatomy of *Hevea* and its influence on latex production [M]. Kula Lumper: Malaysia Rubber Research and Development Board.

HAO BZ, WU JL, 2000. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenicacid [J]. Ann Bot London, 85(1): 37-43.

ICHIHARA A, SHIRAISHI K, SATO H, et al., 1977. The structure of coronatine [J]. J Amer Chem Soc, 99 (2): 636-637.

KATSIR L, SCHILMILLER A, STASWICK P et al., 2008. COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine [J]. Plant Natl Acad Sci USA, 105(19): 7100-7105.

PAIANO A, MARGIOTTA A, DE LM, et al., 2019. Yeast two-hybrid assay to identify interacting proteins [J]. Curr Protein Pept Sc, 95(1): e70.

PHIZICKY EM, FIELDS S, 1995. Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis [J]. Microbiol Reviews, 59(1): 94-123.

TANG CR, YANG M, FANG YJ, et al., 2016. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation [J]. Nat Plants, 2(6): 16073.

TIAN WM, SHI MJ, YU FY, et al., 2003. Localized effects of mechanical wounding and exogenous jasmonic acid on the induction of secondary laticifer differentiation in relation to the distribution of jasmonic acid in *Hevea brasiliensis* [J]. Acta Bot Sin, 45(11): 1366-1372.

VAN CW, BEYAERT R, 1999. Yeast two-hybrid: State of the art[J]. Biol Proc Online, 2(1): 1-38.

WU JL, HAO BZ, Tan HY, 2002. Wound-induced differentiation in *Hevea brasiliensis* shoots mediated by jasmonic acid [J]. J Rubb Res, 5(1): 53-63.

WU SH, ZHANG SX, CHAO JQ, et al., 2023. Differential miRNA expression profiling reveals a correlation between *hbr-miR156* and laticifer differentiation in rubber trees [J]. Ind Crop Prod, 192: 116067.

WU SH, ZHANG SX, CHAO JQ, et al., 2016. Transcriptome analysis of the signalling networks in coronatine-induced secondary laticifer differentiation from vascular cambia in rubber trees [J]. Sci Rep, 6: 36384.

ZHANG SX, TIAN WM, 2015. Cross talk between cytokinin and jasmonates in regulating the secondary laticifer differentiation in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)[J]. J Rubb Res, 18(1): 38-48.

ZHANG SX, WU SH, CHEN YY, et al., 2015. Analysis of differentially expressed genes associated with coronatine-induced laticifer differentiation in the rubber tree by subtractive hybridization suppression [J]. PLoS ONE, 10(7): e0132070.

ZHANG SX, WU SH, TIAN WM, 2016. The secondary laticifer differentiation in rubber tree is induced by trichostatin A, an inhibitor of histone acetylation [J]. Front Agric Sci Eng, 3(4): 357-362.